

## 明細書

## galectin-2 遺伝子内一塩基多型を用いた炎症性疾患の判定方法

## 技術分野

本発明は、galectin-2（ガレクチン-2）遺伝子に存在する遺伝子多型を検出することを含む炎症性疾患の診断方法、該方法に使用されるオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含む炎症性疾患診断用キット、並びにそれらの利用に関する。

## 背景技術

ライフスタイルの変化及び新しい薬理学的アプローチにも関わらず、心筋梗塞を含む冠状動脈疾患は多くの国々において主要な死亡原因となっている（Breslow, J.L., Nature Med. 3, 600-601, 1997; Braunwald, E., N. Engl. J. Med., 337, 1360-1369, 1997）。従って、それらの発症における遺伝的及び環境的因子を同定することが強く望まれている。

共通の遺伝的変異は、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病に罹患する危険性と顕著に関連していることが知られている（Risch, N., et al., Science, 273, 1516-1517, 1996; Collins, F.S., et al., Science, 278, 1580-1581, 1997; Lander, E.S., et al., Science, 274, 536-539, 1996）。多遺伝子性疾患の感受性遺伝子を同定するには、「連鎖」を利用する方法と、「関連」を利用する方法がある。連鎖解析では、疾患感受性遺伝子の座位と遺伝マーカー（主としてマイクロサテライト）の座位が連鎖しているかを検出する、すなわち遺伝子座位間の関係を調べるのに対して、関連解析では特定の遺伝マーカー（主として一塩基多型：SNP）のどの型（アレル：対立遺伝子）が疾患と関連しているかを検出する、つまり対立遺伝子間の関係を調べる。従って、共通の変異をマーカーとして用いる関連解析は疾患関連遺伝子の局在に対する連鎖解析のよりもずっと強力といえる。一塩基多型（SNPs）は、疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際の有用な多型マーカーとなる。SNPsは、遺伝子産物の質や量に直接影響を与えたり、ある疾患や薬剤による重篤な副作用に対する危険性を増やすことがある。よって、多くのSNPsを探索するこ

とにより、疾患関連遺伝子の同定や薬剤による副作用を避ける診断方法の確立に寄与できることを期待される。

遺伝子変異と心筋梗塞との関係については、これまでヒトプロスタサイクリン合成酵素遺伝子の多型を分析して心筋梗塞の遺伝的要因を判定する方法（特開 2002-136291 号公報）などがある。しかしながら、心筋梗塞と関連のある遺伝子変異の解明は未だ十分なものではない。

一方、現在までの所、哺乳類には 10 種類のガレクチンが知られている。そのうちの galectin-2 は galectin-1 に対して 43% と高い相同性を示す。galectin-2 は galectin-1 と同様、14 kDa のサブユニット 2 つからなる非共有結合性の二量体を形成し、還元剤非存在下では自己凝集し、活性を失う。また、galectin-2 は galectin-1 と比較して組織分布は狭い。galectin-1 の場合、筋肉等の間充組織をはじめ様々な細胞系列に豊富に存在するが、galectin-2 は正常成人組織の中では下部小腸を主とした上皮細胞に多く認められる。galectin-2 の詳細な機能についてはまだ解明されていない（Trends in Glycoscience and Glycotechnology Vol. 9, No. 45, (1997) pp. 87-93）。

## 発明の開示

本発明は、心筋梗塞等の炎症性疾患の発症進展に関与する新規な一塩基多型（SNP）を同定することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、同定した SNP を利用して、心筋梗塞等の炎症性疾患の診断法、又は炎症性疾患の治療薬の開発法を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、galectin-1 および galectin-2 遺伝子産物が心筋梗塞感受性遺伝子産物 lymphotoxin-alpha（LTA）に結合すること、並びに galectin-2 遺伝子内の新規一塩基多型（SNP）が心筋梗塞の発症進展に関連していることを同定することにより本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

好ましくは、galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

さらに好ましくは、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

好ましくは、炎症性疾患は心筋梗塞である。

本発明の別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

好ましくは、プライマーはフォワードプライマー及び／又はリバースプライマーである。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のいずれかに記載のオリゴヌクレチドの 1 種以上を含む、炎症性疾患診断用キットが提供される。好ましくは、炎症性疾患は心筋梗塞である。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を検出することを含む、galectin-2 の発現状態の分析方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を変化させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。好ましくは、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を増大させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患

の治療薬のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、候補物質の存在下でリンホトキシン- $\alpha$  (LTA) と galectin-2 遺伝子産物又は galectin-1 遺伝子産物との結合を測定し、該結合を阻害する物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、galectin-2 の転写活性の測定方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する物質のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のスクリーニング方法により得られる galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する物質が提供される。

本発明の方法で好ましくは、前記 galectin-2 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。さらに好ましくは、前記リポーター遺伝子はルシフェラーゼ遺伝子である。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を含む galectin-2 遺伝子断片と galectin-2 の転写制御因子の存在が予想される試料とを接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することを含む、galectin-2 の転写制御因子のスクリーニング方法が提供される。好ましくは、検出はゲルシフトアッセイにより行われる。

## 図面の簡単な説明

図1は、LTAと galectin-1 及び-2 とのインビトロでの結合を確認した実験の結果を示す。

図2は、galectin-2 遺伝子のイントロン1の3279C>TのSNPが転写活性に与える影響を調べた結果を示す。

図3は、galectin-2 と微小管との相互作用を調べた結果を示す。aはTAPのタグの galectin-2 と相互作用タンパク質の単離を示す。bは、内因性 $\alpha$ -チューブリンとFlagのタグのついた galectin-2 又はLTA との共免疫沈降の実験結果を示す。cは、U937 細胞における内因性 $\alpha$ -チューブリンと内因性 galectin-2 又はLTA との共局在の実験結果を示す。

図4は、冠状動脈粥腫切除切片における galectin-2 と LTA の発現及び共局在を調べた結果を示す。aは抗ヒトLTAで染色、bは抗ヒト galectin-2 で染色、cはモノクローナル抗SMC $\alpha$ -アクチンで染色、dはモノクローナル抗CD68で染色した。eは、抗LTA抗体及び抗 galectin-2 抗体で二重染色した。fは、抗ヒトLTAで染色した。

## 発明を実施するための最良の形態

本発明では、galectin-1 および galectin-2 遺伝子産物が心筋梗塞等の炎症性疾患感受性遺伝子産物として知られている lymphotoxin-alpha (LTA) (Ozaki K et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002) 産物と結合することを同定した。さらに、galectin-2 遺伝子内の新規一塩基多型 (SNP) を同定し、それぞれ約2000人の心筋梗塞患者群とコントロール群についてPCR-DNAシーケンス法によりタイピングし、相関解析 (カイ二乗検定など) を行った結果、この新規SNPの頻度が統計学的に有意に心筋梗塞患者で少ないことを見出した。さらにルシフェラーゼアッセイ法を用いた実験により、この新規SNPが実際に生物学的機能を有し、この galectin-2 遺伝子産物量の変化が心筋梗塞に限らず様々な炎症性疾患を引き起こすことを明らかにした。

上記の通り、本発明では、LTAタンパク質に結合する新たな分子として

galectin-1 および galectin-2 タンパク質を同定した。さらに galectin-2 遺伝子内の新規 SNP が生物学的な機能を有し、心筋梗塞等の疾患に関連することを同定した。従って、本発明により同定された galectin-2 遺伝子の新規 SNP を利用することにより、心筋梗塞等の炎症性疾患の新たな診断、予防法、治療薬の開発が可能になる。以下、本発明の実施の形態についてさらに具体的に説明する。

#### [1] 炎症性疾患の判定方法

本発明の方法は、炎症性疾患と関連性を示す galectin-2 遺伝子に存在する遺伝子多型、特には一塩基多型 (SNPs) を検出することによって、炎症性疾患の発症の有無、あるいは炎症性疾患の発症の可能性を判定する方法である。

本発明において「galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型 (一塩基多型など) を検出する」とは、(i) 当該遺伝子多型 (遺伝子側多型と称する) を直接検出すること、及び (ii) 前記遺伝子の相補配列側に存在する遺伝子多型 (相補側多型と称する) を検出し、その検出結果から遺伝子側多型を推定することの双方を指すものとする。ただし、遺伝子側の塩基と相補配列側の塩基とが完全に相補的な関係にあるとは限らないという理由から、遺伝子側多型を直接検出することがより好ましい。

galectin-2 遺伝子に存在する遺伝子多型の好ましい具体例としては、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を挙げることができる。

本明細書において、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基は、配列番号 2 に示す galectin-2 遺伝子のゲノム配列の 3 4 4 9 番目の塩基に相当する。

例えば、後記表 1 に示すように、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3 2 7 9 番目の塩基が C である場合 (galectin-2 イントロン 1 3 2 7 9 C) は、炎症性疾患が発症している、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

これに対し、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3 2 7 9 番目の塩基が T である場合 (galectin-2 イントロン 1 3 2 7 9 T) は、

炎症性疾患が発症していない、あるいは発症の可能性が低いと判定できる。

本明細書において、疾患の「判定」とは疾患発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断（罹患危険性の予想）、疾患の遺伝的要因の解明などをいう。

また、疾患の「判定」は、上記の一塩基多型の検出法による結果と、所望により他の多型分析（VNTRやRFLP）及び／又は他の検査結果と合わせて行うこともできる。

また、本明細書において、「炎症性疾患」とは、炎症性病態との相関が知られている細胞接着因子やサイトカインの誘導が認められる疾患であれば特に限定はされないが、例えば慢性関節リウマチ、全身性エリマトーデス、炎症性腸炎、種々のアレルギー反応、細菌性ショック、心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患などが挙げられ、特には心筋梗塞が挙げられる。

#### （検出対象）

遺伝子多型の検出の対象は、ゲノムDNAが好ましいが、場合によっては（つまり多型部位及びその隣接領域の配列がゲノムと同一または完全相補的になっている場合）cDNA、又はmRNAを使用することもできる。また、上記対象を採取する試料としては、任意の生物学的試料、例えば血液、骨髄液、精液、腹腔液、尿等の体液；肝臓等の組織細胞；毛髪等の体毛等が挙げられる。ゲノムDNA等は、これらの試料より常法に従い抽出、精製し、調製することができる。

#### （増幅）

遺伝子多型を検出するにあたっては、まず遺伝子多型を含む部分を増幅する。増幅は、例えばPCR法によって行われるが、他の公知の増幅方法、例えばNASBA法、LCR法、SDA法、LAMP法等で行ってもよい。

プライマーの選択は、例えば、配列番号1（又は配列番号3）に示される配列における、前記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも10塩基以上、好ましくは10～100塩基、より好ましくは10～50塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅するように行う。

プライマーは、前記の一塩基多型部位を含む所定塩基数の配列を増幅するためのプライマーとして機能し得る限り、その配列において1又はそれ以上の置換、欠失、

付加を含んでもよい。

増幅のために用いるプライマーは、試料が一の対立遺伝子型の場合にのみ増幅されるようにフォワードプライマー又はリバースプライマーの一方が一塩基多型部位にハイブリダイズするように選択してもよい。プライマーは必要に応じて蛍光物質や放射性物質等により標識することができる。

#### (遺伝子多型の検出)

遺伝子多型の検出は、一の対立遺伝子型に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより行うことができる。プローブは、必要に応じて、蛍光物質や放射性物質等の適当な手段により標識してもよい。プローブは、前記の一塩基多型部位を含み、被検試料とハイブリダイズし、採用する検出条件下に検出可能な程度の特異性を与えるものである限り何等限定はない。プローブとしては、例えば配列番号 1

(又は配列番号 3) に示す配列における前記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも 10 塩基以上、好ましくは 10～100 塩基の配列、より好ましくは 10～50 塩基の配列、又はそれらの相補配列にハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドを用いることができる。また、一塩基多型部位がプローブのほぼ中心部に存在するようにオリゴヌクレオチドを選択するのが好ましい。該オリゴヌクレオチドは、プローブとして機能し得る限り、即ち、目的の対立遺伝子型の配列とハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の配列とはハイブリダイズしない条件下でハイブリダイズする限り、その配列において 1 又はそれ以上の置換、欠失、付加を含んでもよい。また、プローブには、RCA (rolling circle amplification) 法による増幅に用いられる一本鎖プローブ (パドロックプローブ) のように、ゲノム DNA とアニールし、環状になることによって上記のプローブの条件を満たすプローブが含まれる。

本発明に用いるハイブリダイゼーション条件は、対立遺伝子型を区別するのに十分な条件である。例えば、試料が一の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズしないような条件、例えばストリンジентな条件である。ここで、「ストリンジентな条件」としては、例えば、例えば、モレキュラークロニング・ア・ラボラトリーマニュアル第 2 版 (Sam



brook et al., 1989) に記載の条件等が挙げられる。具体的には、例えば、 $6\times$ SSC ( $1\times$ SSCの組成： $0.15\text{M NaCl}$ 、 $0.015\text{M}$ クエン酸ナトリウム、 $\text{pH}7.0$ )、 $0.5\%$ SDS、 $5\times$ デンハート及び $100\text{mg/ml}$ ニシン精子DNAを含む溶液中プローブとともに $65^\circ\text{C}$ で一晩保温するという条件等が挙げられる。

プローブは、一端を基板に固定してDNAチップとして用いることもできる。この場合、DNAチップには、一の対立遺伝子型に対応するプローブのみが固定されていても、両方の対立遺伝子型に対応するプローブが固定されていてもよい。

遺伝子多型の検出は、制限酵素断片長多型分析法 (RFLP: Restriction fragment length polymorphism) により行うこともできる。この方法では、一塩基多型部位がいずれの遺伝子型をとるかによって制限酵素により切断されるか否かが異なってくる制限酵素で試料核酸を消化し、消化物の断片の大きさを調べることにより、該制限酵素で試料核酸が切断されたか否かを調べ、それによって試料の多型を分析する。

遺伝子多型の検出は、増幅産物を直接配列決定することによって行ってもよい (ダイレクトシーケンシング法)。配列決定は、例えばジデオキシ法、Maxam-Gilbert法等の公知の方法により行うことができる。

遺伝子多型の検出はまた、変性勾配ゲル電気泳動法 (DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis)、一本鎖コンフォメーション多型解析 (SSCP: single strand conformation polymorphism)、対立遺伝子特異的PCR (allele-specific PCR)、ASO (allele-specific oligonucleotide) によるハイブリダイゼーション法、ミスマッチ部位の化学的切断 (CCM: chemical cleavage of mismatches)、HET (heteroduplex method) 法、PEX (primer extension) 法、RCA (rolling circle amplification) 法等を用いることができる。

## [2] 炎症性疾患診断用キット

前記のプライマー又はプローブとしてのオリゴヌクレオチドは、これを含む炎症疾患診断用キットとして提供できる、キットは、上記遺伝子多型の分析法に使用される制限酵素、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、標識、緩衝液等を含んでい

てもよい。

### [3] galectin-2 の発現状態の分析方法

本発明によればまた、前記した一塩基多型を検出することによって、galectin-2 の発現状態を分析することができる。

例えば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3 2 7 9 番目の塩基が C である場合 (galectin-2 イントロン 1 3 2 7 9 C) は、galectin-2 の発現量が低いと判断できる。これに対し、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3 2 7 9 番目の塩基が T である場合 (galectin-2 イントロン 1 3 2 7 9 T) である場合は、galectin-2 の発現量が高いと判断できる。

### [4] 炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法

本発明によれば、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を変化させる物質を選択することによって、炎症性疾患の治療薬をスクリーニングすることができる。例えば、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を増大又は減少させる物質を選択することができ、特に好ましくはその発現量を増大させる物質を選択することができる。さらに本発明によれば、候補物質の存在下でリンホトキシン- $\alpha$  (LTA) と galectin-2 遺伝子産物又は galectin-1 遺伝子産物との結合を測定し、該結合を阻害する物質を選択することによって、炎症性疾患の治療薬をスクリーニングすることができる。

上記スクリーニングの一例としては、細胞と候補物質とを接触させる工程、細胞内における galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較して当該遺伝子の発現量を変化させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程により行うことができる。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、コンビナトリアルライブラリーでもよい。候補物質は、好ましくは低分子化合物であ

り、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

#### [5] galectin-2 の転写活性の測定方法

本発明によればまた、前記した一塩基多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによって galectin-2 の転写活性を測定することができる。

本発明の好ましい態様によれば、前記 galectin-2 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、一塩基多型がプロモーター部位に存在する場合は、その一塩基多型を含む遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を培養し、レポーター活性を測定すれば、一塩基多型による転写効率に違いを測定することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール、アセチルトランスフェラーゼ、ガラクトシダーゼなどの遺伝子が用いられる。

#### [6] galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する物質のスクリーニング方法

本発明においては、前記した一塩基多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによって galectin-2 転写活性を阻害又は促進する物質をスクリーニングすることができる。

本発明の好ましい態様によれば、前記 galectin-2 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、galectin-2の発現量が有意に高いことが認められる一塩基多型（例えば、galectin-2 イントロン1 3279T）を有する遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を候補物質の存在下又は非存在下の両方の場合について培養し、候補物質の存在下で培養を行った場合にレポーター活性が下がれば、その候補物質はgalectin-2転写活性阻害物質として選択することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、上記に挙げた遺伝子が用いられる。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、コンビナトリアルライブラリーでもよい。候補物質は、好ましくは低分子化合物であり、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

上記のスクリーニング法により得られるgalectin-2の転写活性を阻害又は促進する物質もまた本発明の範囲内である。このようなgalectin-2の転写活性を阻害又は促進する物質は、心筋梗塞治療剤、抗炎症剤、免疫抑制剤などの各種薬剤の候補物質として有用である。

#### [7] galectin-2 の転写制御因子のスクリーニング方法

本発明においてはまた、前記した一塩基多型を含む遺伝子断片と galectin-2 の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することによって、galectin-2 の転写制御因子をスクリーニングすることもできる。前記の一塩基多型を含む遺伝子断片と galectin-2 の転写制御因子の存在が予想される物質との結合の検出は、ゲルシフト法（電気泳動移動度シフト解析：electrophoretic mobility shift assay, EMSA）、DNase I フットプリント法等によって行うことができるが、ゲルシフト法が好ましい。ゲルシフト法では、タンパク質（転写制御因子）が結合すると、分子サイズが大きくなり電気泳動におけるDNAの移動度が低下するので、 $^{32}\text{P}$ で標識した遺伝子断片と転写制御因子を混ぜ、ゲル電気泳動にかける。オートラジオグラフィーでDNAの位置を見ると、因子の結合したDNAはゆっくり動くので、通常バンドよりも遅れて移動するバンドとして検出される。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

#### 実施例

##### (A) 方法・材料

## (1) E. coli two hybrid system

BacterioMach™ Two Hybrid System construction kit (Stratagene 社製) を用いて行った。ライブラリー作製のための培養ヒト冠状動脈血管平滑筋細胞 (HCASMC) は、BioWhittaker 社より購入した。1 × 10<sup>7</sup> 個の細胞より FastTrack 2.0 kit (Invitrogen 社) を用いて mRNA を調製し、5 μg の HCASMC mRNA を用い、添付プロトコールに従って cDNA ライブラリーを作製し、添付プロトコールに従って Two-hybrid スクリーニングを施行した。

## (2) リコンビナント galectin-1、-2、-3 及び LTA の作製、免疫沈降による LTA と galectin の結合確認

galectin-1、-2、-3 は、全長を pET 28 vector system (Novagen 社) で組み換え体を作製し、添付プロトコールに従って大腸菌で発現、精製した。また、LTA は pET29 system (Novagen 社) により作製した。抗 LTA 抗体 (R&D system 社) は HiTrap NHS-activated HP sepharose (Amersham 社) に添付プロトコールに従って架橋した (抗 LTA 抗体セファロース)。LTA-galectin の結合実験は、10ml binding buffer [10mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl] 中に 5 μg の galectin-1 あるいは galectin-2 あるいは galectin-3 を加え、さらに 1 時間攪拌した。1600 回転で 10 分間遠心し、上清を捨て、沈殿を wash buffer [10mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% NP-40] で 3 回洗浄し、50 μl の 5 × SDS-sample buffer (125mM Tris/HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% beta-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue, pH6.8) で溶解しサンプルとした。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜に移し、抗 T7 抗体 (Novagen 社) を用いて、ECL 法 (Amersham 社) によりシグナルを検出した。COS7 細胞 (Riken cell bank) を用いた強制発現系による LTA と galectin-2 の相互作用 (結合) の確認では、pFLAG-CMV-5a vector (コスモバイオ社) に LTA を、pCMV-Myc vector (Clontech 社) に galectin-2 を組み換え体として導入し、COS7 細胞に FuGene reagent (ロッシュ社) を用いてトランスフェクションした。36 時間後の細胞を回収、細胞タンパク抽出バッファ [10mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 0.5% NP-40] によりタンパクを抽出した後、非特異的吸着を抑制するために、この抽出液

に 50  $\mu$ l の protein A sepharose (Amersham 社) を加え 1 時間攪拌し、1 6 0 0 回転で 1 0 分間遠心し、上清を免疫沈降のサンプルとした。サンプルに 5  $\mu$ g の抗 LTA 抗体を加え 1 7  $^{\circ}$ C で 1 時間攪拌後、protein A sepharose 5 0  $\mu$ l を加え 1 7  $^{\circ}$ C で 1 時間攪拌し、1 6 0 0 回転で 1 0 分間遠心し、沈殿を wash buffer [10mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% NP-40] で 3 回洗浄してサンプルとした。SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に移し、抗 Myc-tag 抗体 (SANTA CRUZ 社)、抗 FLAG-tag 抗体 (SIGMA 社) によりシグナルを検出した。

### (3) galectin-2 遺伝子内 SNPs と心筋梗塞との相関解析

心筋梗塞患者とコントロール群、その DNA の採取方法、DNA のシーケンス法、DNA タイピング法、相関解析の統計学的手法は既報に従っている (Ozaki K et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002)。galectin-1 および galectin-2 遺伝子領域の SNPs は、それぞれ 1 6 人の心筋梗塞およびコントロールからの DNA を用いた PCR ダイレクトシーケンス法により同定・発見した。

### (4) ルシフェラーゼアッセイ法

galectin-2 遺伝子の 3 1 8 8 から 3 4 0 4 までの intron 1 3 2 7 9 C あるいは T の SNP を含む領域をゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅し galectin-2 promoter-pGL3-enhancer ベクターのルシフェラーゼの下流にクローニングした。これらのプラスミド 2  $\mu$ g 及び 1 0 0 mg の pRL-TK ベクター (promega 社 ; トランスフェクション効率を合わせるための内部標準ベクター) を HeLa 細胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク、JCRB 9 0 0 4) および HepG2 細胞に FuGene reagent を用いてトランスフェクションした。2 4 時間後細胞を集め、ルシフェラーゼ活性を測定した。

### (5) タンデムアフィニティー精製

タンデムアフィニティー精製は、Rigaut, G et al. Nature Biotechnol, 17, 1030-1032 (1999) に記載の方法に準じて行った。His tag、TEV 切断部位、及び S tag を TAPtag 配列としてコードする融合カセットを pCMV-Myc ベクター (シグマ社) 中に構築した。この TAP ベクターは、サイトメガロウイルスプロモーターの制御下で哺乳動物細胞中に、カルボキシ末端に TAP タグを有しアミノ末端に Myc

タグのついた標的タンパク質を発現する。TAP ベクターをHeLa細胞（ヒューマンサイエンス研究資源バンク、JCRB9004）に一過性にトランスフェクションした。標的タンパク質のバンドをAPRO Life ScienceのMALDI/TOF mass スペクトル測定装置により分析した。

#### （6）共免疫沈降実験

内因性 $\alpha$ -チューブリンとFlagのタグのついたgalectin-2又はLTAを用いて共免疫沈降実験を以下の通り行った。Flag又はSのタグのついたLTA、galectin-2、そしてlacZ（陰性対照）をHeLa細胞にFugeneを用いてトランスフェクションした。免疫沈降は、溶解緩衝液（20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Nonident P-40）中で行った。トランスフェクションの24時間後、細胞を溶解し、免疫沈降を抗-Flag tag M2 アガロース（シグマ社）を用いて行った。HRP 結合 S-プロテイン（Novagen）、抗-Flag M2 ペルオキシダーゼ結合体（Sigma）又はヒト $\alpha$ -チューブリンに対するマウスモノクローナル抗体（Molecular Probes）、及びHRP 結合抗マウスIgG抗体を用いて、免疫複合体を可視化した。

#### （7）共焦点顕微鏡分析

ポリクローナル抗ヒトgalectin-2抗血清を、大腸菌で合成した組み換えタンパク質を用いてウサギで作成した。この抗血清は、ウェスタンブロット分析によれば、構造が類似しているgalectin-1及びgalectin-3との交差反応性を示さなかった。ポリクローナル抗galectin-2抗血清、及びヤギ抗ヒトLTA IgG（R&D System）又はマウス抗ヒト $\alpha$ -チューブリンモノクローナルIgM抗体を、Alexa 二次抗体（Molecular Probes）と一緒に使用した。U937細胞（ヒューマンサイエンス研究資源バンク、JCRB9021）を、ホルボールミリスレートアセテート（PMA）（20 ng/ml）で30分間刺激し、固定した。その後、3%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水中で対応する一次抗体、そして対応するAlexa 二次抗体と一緒にインキュベートした。

#### （8）免疫組織化学分析

組織試料は、16名の心筋梗塞患者から方向性冠状動脈粥腫切除術により取得した。免疫組織化学分析は、ヤギ抗ヒトLTA IgG（R&D Systems）及びウサギポリクロ

ーナル抗ヒト galectin-2 抗体を用いて既報 (Minami, M et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21, 1796-1800 (2001) ; 及び Shi, S.R., et al., Hum. Mutat. 15, 7-12 (2000)) の通り行った。隣接する切片の染色は、SMC-2 アクチン及び CD68 に対するヒト細胞型特異的モノクローナル抗体 (DAKO) を用いて行った。二重標識した免疫組織化学分析としては、切片を先ず抗 LTA 抗体とインキュベートし、それからビオチン化ブタ抗ヤギ IgG、そしてアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体とインキュベートし、3, 3' -ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (Vector Labs) で可視化した。続いて切片をウサギポリクローナル抗ヒト galectin-2 抗体とインキュベートし、そしてアルカリホスファターゼ結合ブタ抗ウサギ IgG とインキュベートし、5 -ブromo-4 -クロロ-3 -インドキシルホスフェートおよびニトロブルーテトラゾリウムクロライド (BCIP/NBT) 基質系で可視化した。

## (B) 結果

### (1) 心筋梗塞感受性遺伝子産物 L T A に結合するタンパク質の同定 (スクリーニング)

L T A に結合する新規タンパクをスクリーニングするために E. coli two hybrid-system を利用し血管平滑筋細胞由来 two hybrid-library より、L T A の結合候補タンパク質として galectin-1 を同定した。

### (2) L T A と galectin-1, 2 のインビトロでの結合の確認

リコンビナント galectin-1 (T 7 t a g を N 末端側に結合) 及び L T A をそれぞれ個別に大腸菌で発現、精製後、抗 L T A 抗体架橋セファロースとこれらを反応し、洗浄後、S D S - P A G E を行い、抗 T 7 抗体を用いたウエスタンブロット法により galectin-1 を検出した (図 1 a)。

図 1 a において、レーン 1 では、galectin-1 を抗 L T A 抗体セファロースを用いて免疫沈降した (陰性コントロール)。レーン 2 では、galectin-1 と L T A とをインキュベートし、複合体を抗 L T A 抗体セファロースを用いて免疫沈降した。レーン 3 では、1 0 0 n g の組換え galectin-1 を陽性コントロールとして用いた。星印は、抗 L T A 抗体セファロース中のイムノグロブリン (I g) 重鎖及び軽鎖に



由来する非特異的バンドを示す。

また、galectin-1 と高いホモロジーを有する galectin-2 および 3 についても大腸菌よりリコンビナントプロテインを作製して、同様の手法により L T A との結合を確認したところ、galectin-2 も L T A と結合することが明らかとなった（図 1 b）。

図 1 b では、L T A と共沈降した Galectin を、抗 T 7 t a g モノクローナル抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウス I g G を用いたウエスタンブロット分析により検出した。レーン 1 では、galectin-3 と L T A とをインキュベートし、抗 L T A 抗体セファロースを用いて免疫沈降を行った。レーン 2 では、galectin-2 と L T A とをインキュベートし、複合体を抗 L T A 抗体セファロースを用いて免疫沈降した。レーン 3 では、galectin-2 を抗 L T A 抗体セファロースを用いて免疫沈降した（陰性コントロール）。レーン 4 及び 5 では、100 ng の galectin-3（レーン 4）又は galectin-2（レーン 5）を陽性コントロールとして用いた。星印は、抗 L T A 抗体セファロース中のイムノグロブリン（I g）重鎖及び軽鎖に由来する非特異的バンドを示す。

さらに、galectin-2 については、L T A T h r 2 6 及び L T A A s n 2 6（Ozaki K et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002）との C O S 7 細胞（サル腎臓細胞株）への共強制発現系を用いた実験系により、その結合を培養細胞レベルでも確認した（図 1 c）。

図 1 C は、抗 L T A 抗体を用いた L T A と galectin-2 との共免疫沈降の結果を示す。C O S 7 細胞に M y c タグ付き galectin-2 プラスミド又は F L A G タグ付き L T A プラスミド（T h r 2 6 または A s n 2 6）をトランスフェクションし、ライセートを調製し、プロテイン A セファロースと抗 L T A 抗体とを使用して免疫沈降に供した。L T A と共沈した Galectin-2 を、M y c（Galectin-2）又は F L A G（L T A）-抗モノクローナル抗体-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体を使用したウエスタンブロット分析により検出した。レーン 1 及び 2 では、L T A 2 6 T h r（レーン 1）又は L T A 2 6 A s n（レーン 2）をトランスフェクションして沈降させた（L T A の陽性コントロール）。レーン 3 では、galectin-2

をトランスフェクションして沈降させた (galectin-2 の陽性コントロール)。レーン4及びレーン5では、galectin-2 と L T A 26 T h r (レーン4) 又は L T A 26 A s n (レーン5) をコトランスフェクションし、共沈降させた。

### (3) galectin-2 遺伝子内一塩基多型と心筋梗塞との相関

galectin-1 および-2 が L T A と結合することが明らかとなり、これらの遺伝子産物の機能変化が L T A の機能変化に結びつき、心筋梗塞の感受性に関連している可能性が示唆されることから、これら遺伝子内の一塩基多型 (S N P s) を新たに同定、発見し、その S N P s を用いて、患者、コントロールそれぞれ約 2 3 0 0 例について case-control association study を施行した。その結果、galectin-2 遺伝子内 i n t r o n 1 3 2 7 9 番目 C > T 新規 S N P の minor homozygote (T T allele) が心筋梗塞患者で有意に少ない ( $\chi^2 = 25.3$ ,  $P = 0.0000005$ ; odds ratio = 1.6) ことを見出した (表1) (塩基番号は変異命名による: Dunnen J. T 他、Hum. Mutation 15, 7-12, 2000)。このことから、galectin-2 i n t r o n 1 3 2 7 9 の S N P が心筋梗塞にプロテクティブに働く因子と考えられ、galectin-2 の機能変化が心筋梗塞に関連している可能性が示唆された。

表 1 ; 心筋梗塞と Galectin-2 の SNP との相関

Genotype	MI	Control	$\chi^2$ [P value] (Odds ratio)<95%CI>			
			Genotype frequency	Allele frequency	CC vs Others	TT vs Others
Galectin-2 intron 1						
3279C>T*						
CC	1047(46.8%)	996(41.6%)	29.6	25.5	12.8	25.3
CT	987(44.2%)	1069(44.7%)	[0.00000038]	[0.00000044]	[0.00034]	[0.00000050]
TT	202(9.0%)	329(13.7%)	(1.71)	(1.24)	(1.60)	(1.60)
Total	2236(100%)	2394(100%)	<1.41-2.08> <1.10-1.39> <1.33-1.93>			

今回新たに同定した galectin-2 遺伝子の *i n t r o n* 1 の 3279 番目 C>T の新規 S N P の周辺の塩基配列（配列番号 3：但し、配列番号 3 において Y は C 又は T を示す）を以下に示す。

5' -CCCCCCCAGCTCTAGGGACGACCACACCCCCACCCAGTTCTGCCTGTCTCTCTCTGCGCC  
TTTGACTCTGTTGGGTGGGGACAAGGCTCCCGGGCCTGCACCCTCCCGCAGCTCTCAGCA  
TCCCTATTTGTCCAAGTGCACCCCTGACCCTGGACTTCCGAGTGCTTCTGCCCTGCAGCA  
GCCCCACCTCTATCCTTGGGGTTTGAGCTTTGCTGTTTCAGTCAGGCAGCCCCAGGAG  
CTGCAAGGGGAGTGTGGGTGCTTCTCTTAGTCCAGGCCAGCTCCCCTATCCTGGCCTGA  
CTGTTGCAGGGCTCGGGGTGTGGGCACAGGCTGCTGGCAGGAGGCAGGGAGCCATCTCCT  
GATGCTTGGTGTTAGA[C/T]GTGTGTGTGCGCAGGGCACACGTCTGTGAGTGTCTGTGT  
GGCGGGCACACCTGTCTTCTGTTTCTTGTGTTGAGCCCCTTTTGGACTGTCCTCACTGGAT  
AACCTCATCTCCAGAGATAATGGTCTTTGTCAGTGAGAGACTGATTTTTTTTTTTTTTTT  
TTTTTTTTTTTGAGACGGAGTCT-3'

[C/T] は、*i n t r o n* 1 の 3279 番目 C>T の S N P を示す。

下線を付した CTGCGCCTTTGACTCTGTT と TCTTTGTCAGTGAGAGACTG は P C R p r i  
m e r を示し、下線を付した CCTATCCTGGCCTGACTGTT はシーケンスプライマー  
を示す。

(4) galectin-2 遺伝子 *i n t r o n* 1 3279 の S N P の galectin-2 遺  
伝子転写活性に与える影響

*i n t r o n* 1 3279 の S N P の galectin-2 遺伝子転写活性に与える  
影響を測定するために、レポーター遺伝子アッセイ（ルシフェラーゼアッセイ）  
を施行した。galectin-2 遺伝子の *i n t r o n* 1 3188 から 3404 まで  
のヌクレオチドよりなる DNA フラグメントを、pGL3-*e n h a n c e r* ベ  
クターの SV40 エンハンサーの下流に、5' から 3' の方向にクローニングし、  
レポーターベクターを作製した。これらのレポーターベクターを H e L a 細胞お  
よび H e p G 2 細胞にトランスフェクションし、24 時間後、Dual-Luciferase  
Reporter Assay System (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

結果を図 2 (左図はH e L a 細胞、右図はH e p G 2 細胞での結果を示す) に示す。

#### (5) galectin-2 と微小管との相互作用

galectin-2 による LTA 分泌の制御機構を調べるために、タンデムアフィニティー精製(TAP)システムを用いて、galectin-2 と相互作用する細胞内分子を探索した。その結果、galectin-2-TAP タグを発現させた場合のみに検出できる 2 つの特異的なバンドを同定した (図 3 a)。MALDI/TOF mass スペクトル分析により、これらの 2 つのバンドは、微小管の重要成分である  $\alpha$ -及び  $\beta$ -チューブリンに対応することが示された。Flag のタグをつけた galectin-2 を発現するプラスミドでトランスフェクションした HeLa 細胞を用いて、内因性のチューブリン及び galectin-2 が一緒に免疫沈降することを確認した (図 3 b)。チューブリンは LTA と一緒に免疫沈降した (図 3 b)。二重免疫染色した U937 細胞の共焦点顕微鏡分析像から、galectin-2 及び  $\alpha$ -チューブリンは、細胞質に発達した網状フィラメントネットワークとして一緒に局在化していた (図 3 c)。この結果は galectin-2 が細胞内輸送に関与している可能性を示している。

#### (6) 冠状動脈粥腫切除術による試料における galectin-2 と LTA の発現と共局在

galectin-2 と LTA が、心筋梗塞の損傷 (即ち、冠状動脈のアテローム硬化性損傷) で発現しているかどうか、そして発現している場合にはその発現部位を調べるために、抗 LTA 又は抗 galectin-2 抗体を用いて、冠状動脈粥腫切除試料について免疫組織化学染色分析を行った。図 4 a 及び b に示す通り、LTA 及び galectin-2 についての免疫反応性が、アテローム斑の内膜細胞に検出され、そのうちの一部は紡錘体状、又は限定的に空胞化した丸い細胞質であった。隣接する切片を抗平滑筋細胞 (SMC)  $\alpha$ -アクチン又は抗 CD68 で免疫染色した結果、これらの細胞の大部分は平滑筋細胞であるか、平滑筋細胞由来の泡沫細胞であり、マクロファージも一部に見られた (図 4 c 及び d)。二重標識免疫組織化学分析により、LTA と galectin-2 の共発現が大部分の多形性の平滑筋細胞で見られた (図

4 e)。対照的に、細胞質が僅かな繊維斑の萎縮性平滑筋細胞や、正常な内側の平滑筋細胞では、何れのタンパク質の発現も検出されなかった（図 4 f）。これらの結果は、LTA と galectin-2 が、ヒトのアテローム硬化性斑の内膜の平滑筋細胞及びマクロファージでは共発現しているが、静止期又は正常な内側の平滑筋細胞では存在しないことを示している。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、心筋梗塞等の炎症性疾患の発症進展に関与する新規な一塩基多型（SNP）が新たに同定された。本発明で同定された SNP を利用することにより、心筋梗塞等の炎症性疾患の診断法、又は炎症性疾患の治療薬の開発法を提供することが可能になる。

## 請求の範囲

1. galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。
2. galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。
3. 配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C / T の多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。
4. 炎症性疾患が心筋梗塞である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の方法。
5. 配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基を含む連続する少なくとも 1 0 塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチド。
6. 配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基を含む連続する少なくとも 1 0 塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチド。
7. プライマーがフォワードプライマー及び／又はリバースプライマーである請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチド。
8. 請求項 5 から 7 のいずれかに記載のオリゴヌクレチドの 1 種以上を含む、炎症性疾患診断用キット。
9. 炎症性疾患が心筋梗塞である請求項 8 に記載のキット。
- 1 0. 配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C / T の多型を検出することを含む、galectin-2 の発現状態の分析方法。
- 1 1. 候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝

子の発現量を分析し、その発現量を変化させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

12. 候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を増大させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

13. 候補物質の存在下でリンホトキシン- $\alpha$  (LTA) と galectin-2 遺伝子産物又は galectin-1 遺伝子産物との結合を測定し、該結合を阻害する物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。



図 1

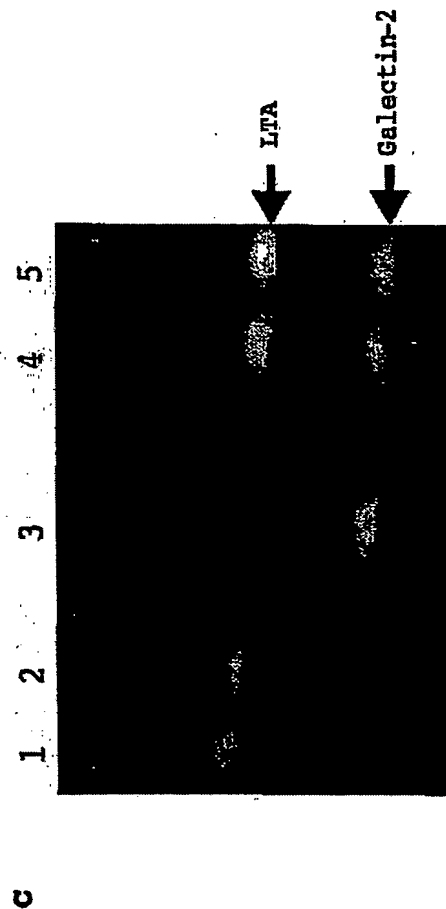
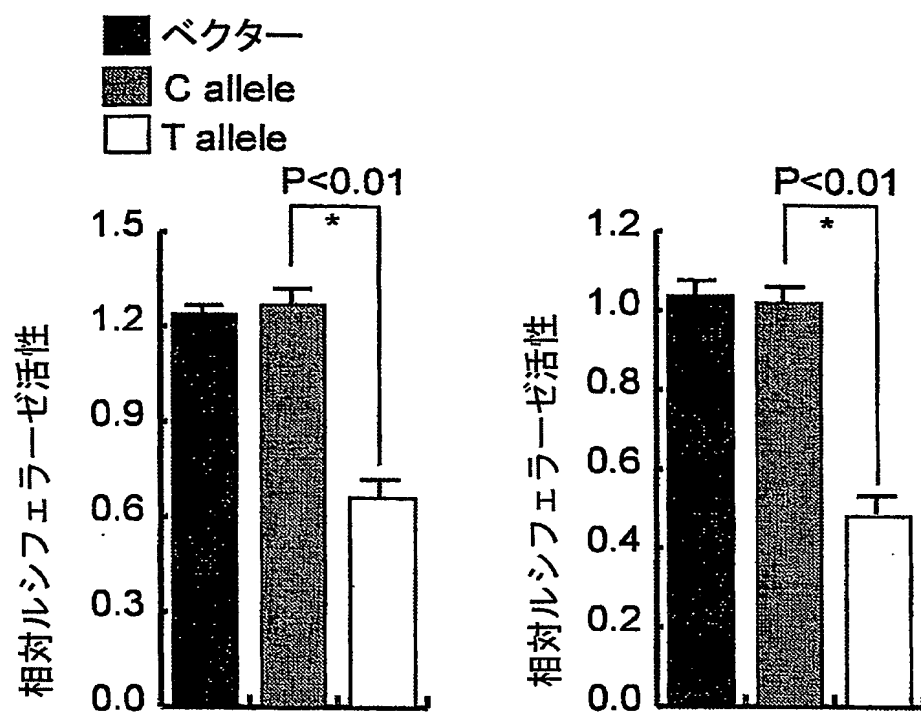


図 2



## 図 3

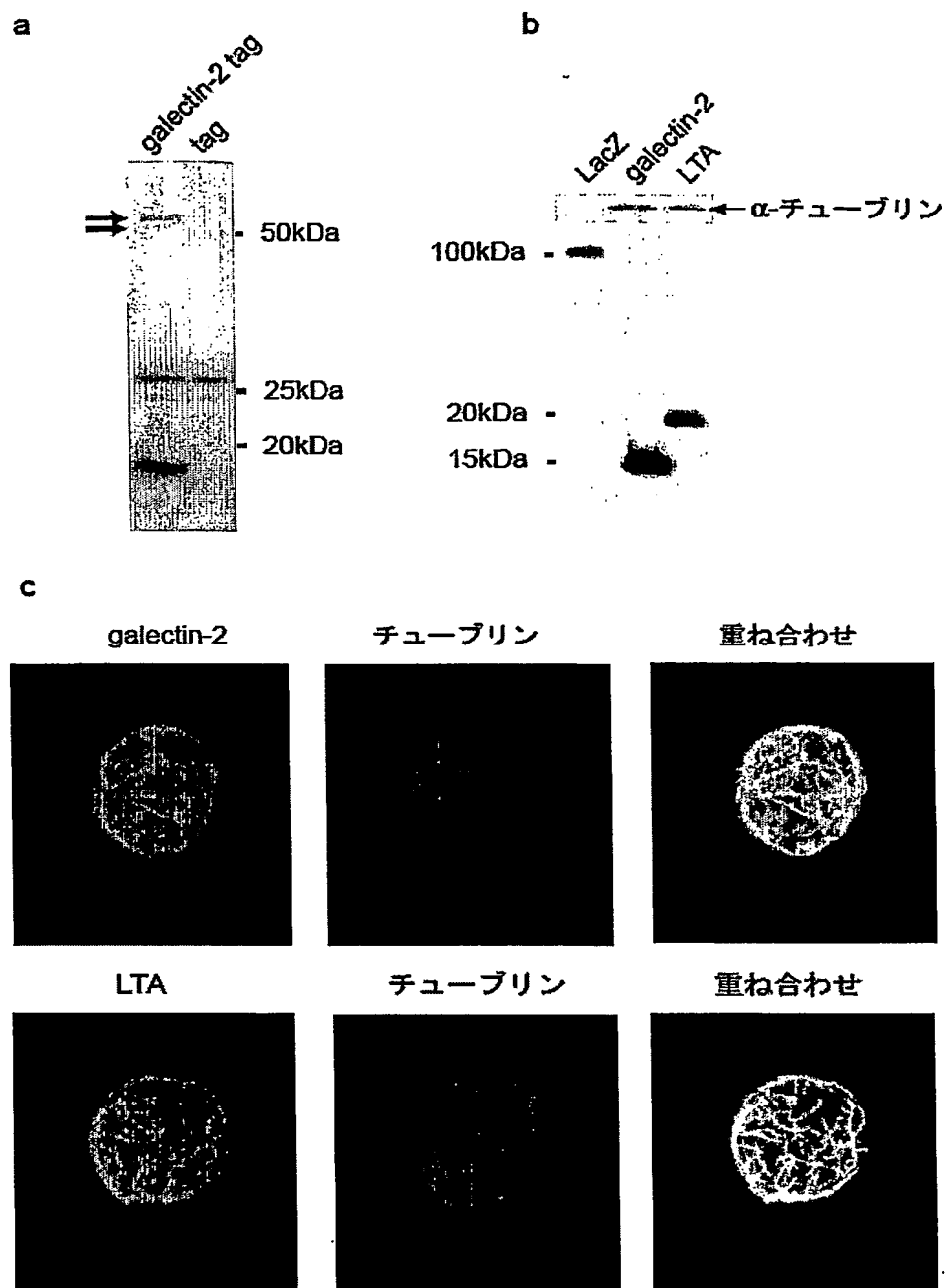
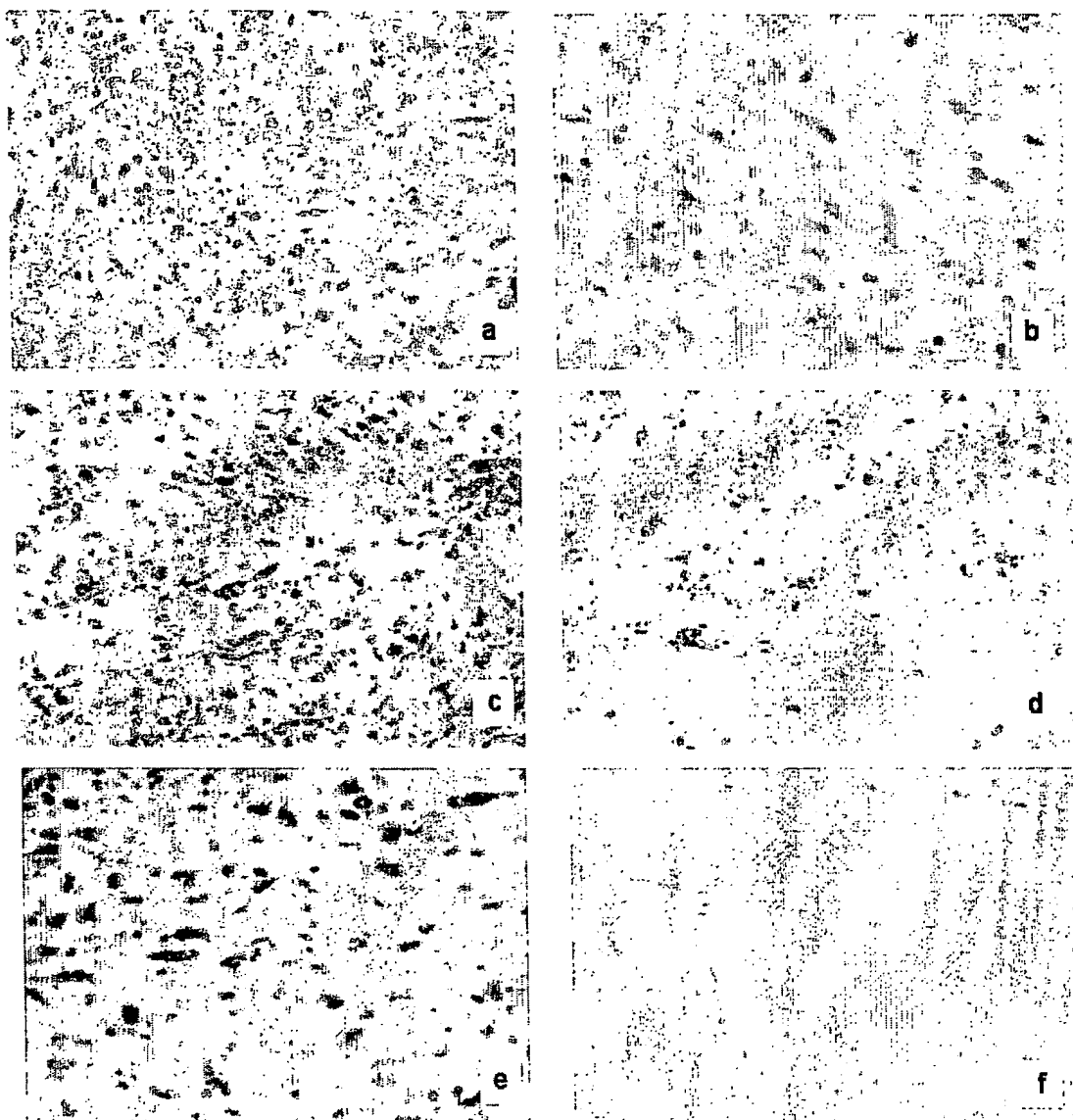


図 4



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; RIKEN et al.

&lt;120&gt; Method for judging inflammatory diseases using single nucleotide polymorphism within galectin-2 gene

&lt;130&gt; A41618A

&lt;160&gt; 3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 7967

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```
gtgaggacac tagccccctg ctgcctgccc cactctgttc atctttgtct ttgcctgggt 60
gggggctttt agggaaaacc attgctgtcc ctctctgggc ctgagtttcc ccatctgtgc 120
agcaaagaag ttggacagag gtcttttttt aaaaaacagc atcttgggccc aggcgtgggtg 180
gctcctgctt gtaatcccag cactttggga ggccgaggct ggtggatcat ctgaggttgg 240
gagtttgaga ccagcctgac caacatggag aaaccccgtc tctactaaaa aaatacaaaa 300
ttggctaggc ctggtggcac atgcctgtaa tcccagctaa tggggaggct gaggcaggag 360
aatcacttgg acctgggagg cagaggttat ggtgagccga gattgtgcca ttgcactcca 420
gcctgggcaa caagagtgag actccatctc aaaacaacaa caacaatata gcatcttgc 480
ctgtcaccag gtggagtgca gtggtggcaa tcataactca ctacggactt gacctccttg 540
gcttaaataga tctctccacc tcagcctctt gagtagctgg gaccccaggc actcactacc 600
acactggcta attttgtttg tttcttttct ttctcttttt tttttttttt ttgagatgga 660
gtctcgctct gttgccagg ctggagtgca gtggcccgat ctgagtcac tgcaacctct 720
gctgcctggg ttcaagcaat tctctggtct cagcctccca agtagctggg attacaggta 780
tgtgtcacca cacctggcta attttttttt ttttggtgag atggagtttc tgttgcccag 840
gctggagtgc aatggcacga tctcggtca ccacaacttc cacctcccag gttcaagcga 900
ttctcctgcc tcagcctcct gagtagcagg gattacaggc atgggccacc acacccgatt 960
```

aattttgtat ttttagtaga gatggggttt ctccatgttg gtcaggctgg tcttgaactc 1020  
ctgatctcag gtgatccacc tgccttggcc tcccaaagtg ctgggattac aggtgtgagc 1080  
cactgctcct ggcctaattt ttgtatTTTT aaagtagaga cagggtttca ccatgttggt 1140  
caggctgac tcgaactcct gacctcaggt gatccgcca ccttggcctc ccaaagtgc 1200  
gggattacag gtgtgagcca cccacccag cttatttctt atttttcgta gagatgaggt 1260  
ctcactatgt tgctcaggct gatatcaaac tcctgggttc aagggatcct cctgccttgg 1320  
cctctcgaag tgctgagatt acagggtgtga gccactgtgc ctggcctcca ttgatcttta 1380  
tagagataaa aaaaaatctc agcttgggca atatagttag accttttctg ctacagggtgc 1440  
atgccactac gctttgcctt aaaaaattag tgggggtagc ggcacactcc tcagccttgg 1500  
gaggctgagg atcacttgag cccaggaggt cgaggctaca gtgagccgta attgcactac 1560  
tgtactccag cctgggcaac agagttagac ctgtctcat atacccacac aaaaaacca 1620  
agtcttgag agcaaattgc ccaaggccac aagctgcaa tcacaagggg ttgagtggat 1680  
tcccactgag gtctctgatt cgttgattct acaccagact ctgccacagc tttactgtgt 1740  
ggccttggcc aagtcactga ccgtctctga gcccagctt tccttacatc tgtggaaggg 1800  
gatcacaggc tgcctcttct gaggattaga tgggtgtattc attgcctagg gctgcaataa 1860  
caaattacca ccaaattgtg ggtggcttca cagcatagac gtttgttctg tcttggtttt 1920  
ggtgactaga aacctgaaac caagggtcta cagggtctacg ctctgtctga aggcgcaagg 1980  
ggagggttct ttcttgctc ttccagcttc tgggtgctcc tcgcattcct tggttgcat 2040  
cactccaatc tctgcctcca acttcacgtg gactcctctg tgtgtctccg tctctgtgtc 2100  
tatatttctc tcctcttatg agaacttg tctgtattga tttaggacca accctaaacc 2160  
agtatgacct cttactcga ttacatatgc aaaggaacta tttttaataa ggtcacattg 2220  
aggctgggcg ggggtggctca cccctgtaat cccagcactt tgggaggccg aggcaggcgg 2280  
atcacttgag atcaggagtt caagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc ctgtctgtac 2340  
tgaaaataca aaaacaaaaa agaagaagaa gaagaaaaaa aaattagaca gatgttgtgg 2400  
tgggcacccg taatcccagc tacttgggag gctgaggcag gagaatcggg tgaacccggg 2460  
aggcagaggt tgcagtgagc cgagatcgag ccaactgtact ccagcctagg tgacagagtg 2520  
agacttcac tcaaaaaaaa aaaaaaaggt cacattgaca ggttcaggt ggacatgaat 2580

tttcggggga cgctattcaa gtgcaggggg gatgcaggat gtgaatgtgc caggggtcct 2640  
gcgtggaagg gtctatgccc tcatcacct ctgcctctcg gggaggactg ctgtggccca 2700  
cggactctcc ccaccttctc ttctctggtc atctcacctc tgccttttct ttctctctc 2760  
tccagctcca gaggccatat catccaaatc ccttatacga cagataaggg aaccaaggcc 2820  
cagaaagggg ctaagctggc cccaggcccc tctgccaat aggggcagag tcggcactag 2880  
agtctgggcc cccaactccc cccccccca gctctaggga cgaccacacc cccaccagt 2940  
tctgcctgtc tctctctcg cctttgactc tgttgggtgg ggacaaggct cccgggcctg 3000  
caccctcccg cagctctcag catccctatt tgtccaagt caccctgac cctggacttc 3060  
cgagtgttc tgccctgcag cagccccac ctctatcctt ggggtttgag ctttctgtt 3120  
tcagtcaggc agccccagg agctgcaagg ggagtgtgg tgcttctctt agtccaggcc 3180  
cagctcccct atcctggcct gactgttgca gggctcgggg tgtgggcaca ggctgctggc 3240  
aggaggcagg gagccatctc ctgatgcttg gtgttagacg tgtgtgtcg cagggcacac 3300  
gtctgtgagt gtctgtgtgg cgggcacacc tgtctctgt ttcttgtttg agcccctttt 3360  
ggactgtcct cactggataa cctcatctcc cagagataat ggtctttgtc agtgagagac 3420  
tgatTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTTga gacggagtct cgctctgtcg cccaggctgg 3480  
agtgcagtgg cgccatcttg gctcactgca agcacgcct cccgggttca cgccattctc 3540  
ctgcctcagc ctcccgagta gctgggacta caggcgctg ccaccacgc cggctaattt 3600  
tttgatTTTT tagtagagac agggtttcac cgtgttagcc aggatgatct cactctcctg 3660  
acctcgtgat ccgccccct cggcctccca aagtgtgtgg attacaggtg tgagccaccg 3720  
cccctggcca gcaagagact gatTTTaatc ccgtctgtct ggctccaaa tctggacca 3780  
accccgttgt gtaagcaaa gacatgggga gttaggtgtc cagcctcaa accccacttt 3840  
ctctaaagca gggaggTTTT gctcccagga gacaacggac cctgtctgga gacattcttg 3900  
gttgtcaccg ctcaggggag ggtgtcactg acatccagtg ggtagaggcc aggaatactg 3960  
ctcaacatcc tacaacacaa gagacagacc ccaacaaaga aatgcctgcc ccaaacgtcc 4020  
agacggccaa ggctgagaag ctctggctcg agcagcctcc tgtctgacat gccgccgtca 4080  
tggcccgtg tcctgggtta agcattgtg cctcctccag gcgtctctta taaaatgtac 4140  
tgccaggccg ggcacagtgg ctacacctg taatcccaac actttgggag gccgaggtgg 4200

gaggatcctt tgagctcagg aggtcaggc tggcctggac aacatagtga gaccccatct 4260  
gaaaaaaaaa aaaatcagct gggccaggct ggatgcctgt ggtccaggct acctgggggg 4320  
ctgagggtggg aggattgctt gagcccaaga ggtcaaggct gtagtgagct ctgatcatat 4380  
cactgcactc tagcctgggt gacagagcaa gacctttaa aaaaaatgta ttaccggctg 4440  
aggcaggagg accacttgag ggtcaggagt tccagagcag cctgggtaac atagcaaac 4500  
cctatctcta caaaaatttt aaaaattagc tgggcatggg ggcacacgtc tatagtcgta 4560  
gctacttagg aggctgaggc aggagaatcg tttgagctca ggaggctatg aggctgcatg 4620  
cagtgagtta taatcgtgct actgcactcc atcttgggtg acagagcaag accctgtctc 4680  
aaaaaaaaaa aaaaaagaaa gaaaagaaaa aaaatgctgg gtgtggtatc tcaccctat 4740  
aatcccagaa ctttgggagg ccagagggg aggatcactt gaggtcagga gttcgagacc 4800  
aacctggcca aagtggtgaa acccgtctc tactaaaaat acaaagaaaa ttagctagat 4860  
atggtggtgg gagcctgtaa tctcagtac tcgggaggct gaggcaggat aattgcttga 4920  
atctgggaag tggaggttgc agtgagccaa gattgcacca ctgcactcca gcatgggtga 4980  
cagagtgaga ctccatctca acatctcaaa aaaaaaaaaa aaagaactta ctgcctgtgg 5040  
aagagttgag caatacctaa caacctacc ctacatgtga ccaaccagcg ggtcacttcc 5100  
tcctctgcag agaggaggcg gctgccagcg agagggcact gagggtcctc ccatggccac 5160  
tgcccccttg acttctggca aagtgcccc gtccaatgag ctattcagg gcatctcaga 5220  
tcattgctttt tctggaaata aaaagtcagt gagcagaact ccacaatgt aaaagtgtcc 5280  
tcccataagt tgttctaaat ctttgggtgcc tgttgctgcc tggtcagacc aacctcacc 5340  
ctctggtcat agatgcgaaa actggtcttg ggtaatgagt tttttttttt tttttttttt 5400  
agacagagtc ttgctctgtc gcctggcaca atctcggctc actgcaacct ccacctcctg 5460  
ggttcaagcg attctcttgc ctgagcctcc caagtagctg ggacgacagg catgtgccac 5520  
cacaccggc taatttttgt atttttaata gagacagggt ttctccatgt tggccaggcc 5580  
agtctcaaac tcctgacctc aggtgatcca ccgactcag cctcccaaag tgctgggatt 5640  
acaggcgtga gccaccgtc ccagccctgg gtaatgagct ttgaaaacc agcttagaaa 5700  
tcttcctag taaccatcgt gaggctagag gaggtccta ctgtacagaa attcaggtgc 5760  
tgctttccta tggaaaataa ggagcagatg aatcttaaca acaagtaatc aaaatgatgg 5820



tcatttgggc agaccactgt ccagaaaaaa agaaaaaatt taaaaaagaa aattaaggct 5880  
gggcttggtt cacgcctgta atcccagcac tttggggagc tgaggtgggc agatcaattg 5940  
aggccaggag tttgagacca gccacaccaa catggtgaaa ctttgtctct actaaaaatg 6000  
caaaaattag gcatggtggt acatgcctgt agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg 6060  
agaatcgctt gaacctgaga ggtggaggtt gcagtgagtc gagatcgcac cgttgcactc 6120  
cagcctgggc gacaaagcaa gactctgctc aaaaaaacia aaaaaaaaac aaaaaaagaa 6180  
aaggaaagta aaacaataaa tgatggtggt cctgtgattt gctgttggtc tacgtgaggc 6240  
cctgtgcatg ggatttcaca aacatgttct tgaatcctct caaaaccagc ttgaaggttg 6300  
gtggtgtctc cctgggtgtga cagggtctgt catacagctg gcattcagca acaacaacaa 6360  
caaaaataga aatgggagtc tcgctatggt gcccaggctg gtctccaact cctgggctca 6420  
agtgaccctc ctgtctcagc atcctgagta gctggaatac aggtacacac ttccacaccc 6480  
aggctatcaa ctgtttttta aatgaataaa tcaaattagt caattttaca gaaggggaaa 6540  
gtgaggcttg gagagagact ttgatggaca taggacttgc ggagttttat agattcttag 6600  
ttttgttcg tttgtttgtt tttgtttttg agacagagtc ttgctctggt gcctaggctg 6660  
gagtgcagtg gcgtgatctt gtcttactgc aacctctgcc tcccaggctt aagccgttct 6720  
cctgcctcag cctcccaagt agctgggact atagatgcgt gccaccacac ctggctaatt 6780  
tttgcathtt tagtagagac aggggttaa atgttaggcaga ctggctctta actcctgacc 6840  
tcaggtgac tggtgcctc ggccctccaa agtgctggga ttacaggtgt gagccactgt 6900  
gcccgccctt tttttttgt ttttcttga gatgaaaagt cactcttgtc gcccaggctg 6960  
gagtgcaatg gtacgatctc agctcatggc aacctccgt tccagaattc aagcaattct 7020  
cccgccctcag cctcccaagt agctgggatt acaggcgccc gccaccatgc gcagataatt 7080  
tattttattt tattttattt attattatta ttattattat tattattatt tttgagatgg 7140  
agtttcgctc tgtcgcccag gctggagggc agtgacgcga tctcacctca ctgcaagctc 7200  
cgccctccgg gttcacacca ttctcctgcc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc 7260  
acctgccacc acaccggct aactttttgt attttttagta gagatggggg ttccacatgt 7320  
tagccaggat ggtctcgatc tcctgacctc gtgatccgcc cgccctgggc tcccaaaagt 7380  
gttgggatta caggtgtgag ccaccgcgtc cggccaattt ttttattttt agtagagacg 7440

aggtttcacc atgttgccca ggctgggtgc taactcctga cctcaggtga tcagcccgcc 7500  
tcggcctccc aaaatgctgg gattacaggc gtgagcccct gcacctggcc agatttagtt 7560  
ttgggtgggc caagatcttg tgcctctgat acagtcattt tccatatcat atttttgttt 7620  
ctggggttct gctgagggca gcgtgatttc atcacttgaa cactttgcgg aactgggcag 7680  
gaagcactct gccatttca tagatgggca aactgagcct ccgtcctgtg cctcttcggg 7740  
ttgggggtgga taagagcaaa acagggcagg gagtggggaa gctctgggag gccttgatca 7800  
gagcgctctg gctctgccac tttccagctt ggtgggtctcc tgcgtcctca cgtgggcagg 7860  
gggattgaga cctgcagctg ggttggcatg aggtggatga agctgctggg caagtgtggg 7920  
attgattttc tgtggggact cgagtggaat gtttctctgt tggccca 7967

<210> 2

<211> 9821

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gggagatgca ggcggggaga cacaaggtag aaggggcaaa gtcctcacct aggaccttga 60  
gggagttaat gtgtaatatt ctaggatata agcttgacca cgagttgaga ccctgagcac 120  
aggcctccag gagccgctgg gagctgccgc caggagctgt caccatgacg gtgaggacac 180  
tagccccctg ctgcctgccc cactctgttc atctttgtct ttgcctgggt gggggctttt 240  
agggaaaacc attgctgtcc ctctctgggc ctgagtttcc ccatctgtgc agcaaagaag 300  
ttggacagag gtcttttttt aaaaaacagc atcttgggcc aggcgtggtg gtcctgctt 360  
gtaatcccag cactttggga ggccgaggct ggtggatcat ctgaggttgg gagtttgaga 420  
ccagcctgac caacatggag aaaccccgtc tctactaaaa aaatacaaaa ttggctaggc 480  
ctggtggcac atgcctgtaa tcccagctaa tggggaggct gaggcaggag aatcacttgg 540  
acctgggagg cagaggttat ggtgagccga gattgtgcca ttgcactcca gcctgggcaa 600  
caagagtgag actccatctc aaaacaacaa caacaataca gcatcttgct ctgtcaccag 660  
gtggagtgca gtggtggcaa tcataactca ctacggactt gacctccttg gcttaaatga 720  
tctcccacc tcagcctctt gagtagctgg gacccaggc actcactacc aactggcta 780

atTTTgtttg tttcttttct ttctcttttt tttttttttt ttgagatgga gtctcgctct 840  
gttgcccagg ctggagtgca gtggcccgat ctgagctcac tgcaacctct gctgcctggg 900  
ttcaagcaat tctctggctc cagcctccca agtagctggg attacaggta tgtgtcacca 960  
cacctggcta attttttttt ttttgttgag atggagtttc tgttgcccag gctggagtgc 1020  
aatggcacga tctcggtcct ccacaacttc cacctcccag gttcaagcga ttctcctgcc 1080  
tcagcctcct gagtagcagg gattacaggc atgggccacc acacccgatt aatTTTgtat 1140  
ttttagtaga gatgggggtt ctccatgttg gtcaggctgg tcttgaactc ctgatctcag 1200  
gtgatccacc tgccttgGCC tcccaaagtG ctgggattac aggtgtgagc cactgctcct 1260  
ggcctaattt ttgtattttt aaagtagaga cagggtttca ccatgttggt caggctgata 1320  
tcgaactcct gacctcaggt gatccgcccc ccttgGctc ccaaagtGct gggattacag 1380  
gtgtgagcca cccacccag ctattttctt attttctgta gagatgaggt ctactatgt 1440  
tgctcaggct gatatcaaac tcctgggttc aagggtcct cctgccttg cctctcgaag 1500  
tgctgagatt acaggtgtga gccactgtgc ctggcctcca ttgatcttta tagagataaa 1560  
aaaaaatctc agcttgggca atatagtgag accttttctg ctacaggtgc atgccactac 1620  
gctttgcctt aaaaaattag tgggggtagc ggcacactcc tcagccttg gaggctgagg 1680  
atcacttgag ccaggagggt cgaggctaca gtgagccgta attgcactac tgtactccag 1740  
cctgggcaac agagtgagac ctgtctcat ataccacac acaaaacca agtcttgag 1800  
agcaattgc ccaaggccac aagctgcaaa tcacaagggg ttgagtggat tccactgag 1860  
gtctctgatt cgttgattct acaccagact ctgccacagc ttactgtgt ggccttgGCC 1920  
aagtactga ccgtctctga gccccagtct tccttacatc tgtggaagg gatcacaggc 1980  
tgctcttctt gaggattaga tgggtattc attgcctagg gctgcaataa caaattacca 2040  
ccaaattgtg ggtggcttca cacgatagac gtttgttctg tcttggtttt ggtgactaga 2100  
aacctgaaac caaggtgcta cagggtacg ctctgctga aggcgcaagg ggagggttct 2160  
ttcttgctc ttccagcttc tgggtgctcc tcgcattcct tggcttgcat cactccaatc 2220  
tctgctcca acttcagtg gactcctctg tgtgtctccg tctctgtgtc tatatttctc 2280  
tcctcttatg agaacactgg tcgtattgga tttaggacca accctaaacc agtatgacct 2340  
cttaactcga ttacatatgc aaaggaacta tttttaaata ggtcacattg aggctgggGc 2400

gggtggctca cccctgtaat cccagcactt tgggaggccg aggcaggcgg atcacttgag 2460  
atcaggagtt caagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc ctgtctgtac tgaaaataca 2520  
aaaacaaaaa agaagaagaa gaagaaaaaa aaattagaca gatgttgtgg tgggcacccg 2580  
taatcccagc tacttgggag gctgaggcag gagaatcggg tgaacccggg aggcagaggt 2640  
tgcagtgage cgagatcgag ccaactgtact ccagcctagg tgacagagtg agacttcac 2700  
tcaaaaaaaaa aaaaaaagggt cacattgaca ggttccagggt ggacatgaat tttcggggga 2760  
cgctattcaa gtgcaggggg gatgcaggat gtgaatgtgc caggggtcct gcgtggaagg 2820  
gtctatgccc tcatcaccct ctgcctctcg gggaggactg ctgtggccca cggactctcc 2880  
ccaccttctc tttcctgggc atctcacctc tgccttttct ttcctctctc tccagctcca 2940  
gaggccatat catccaaatc ctttatacga cagataaggg aaccaaggcc cagaaagggg 3000  
ctaagctggc cccaggcccc tctgccaatt aggggcagag tcggcactag agtctgggcc 3060  
cccaactccc cccccccca gctctaggga cgaccacacc cccaccagt tctgcctgtc 3120  
tctctctgcg cctttgactc tgttgggtgg ggacaaggct cccgggcctg caccctcccg 3180  
cagctctcag catccctatt tgtccaagt caccctgac cctggacttc cgagtgttc 3240  
tgccctgcag cagccccac ctctatcctt ggggtttgag ctttgctgtt tcagtcaggc 3300  
agccccagg agctgcaagg ggagtgtggg tgcttctctt agtccaggcc cagctccct 3360  
atcctggcct gactgttgca gggctcgggg tgtgggcaca ggctgctggc aggaggcagg 3420  
gagccatctc ctgatgcttg gtgttagacg tgtgtgtgcg cagggcacac gtctgtgagt 3480  
gtctgtgtgg cgggcacacc tgtcttctgt ttcttgtttg agccctttt ggactgtcct 3540  
cactggataa cctcatctcc cagagataat ggtctttgtc agtgagagac tgattttttt 3600  
tttttttttt ttttttttga gacggagtct cgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtgg 3660  
cgccatcttg gctcactgca agcacgcct cccgggttca cgccattctc ctgcctcagc 3720  
ctcccgagta gctgggacta caggcgctg ccaccacgcc cggctaattt tttgtatttt 3780  
tagtagagac agggtttcac cgtgttagcc aggatgatct cactctcctg acctcgtgat 3840  
ccgccccct cggcctccca aagtgtggg attacagggtg tgagccaccg cccctggcca 3900  
gcaagagact gattttaac cgtctgtct ggctccaaa tctggacca acccgttgt 3960  
gttaagcaaa gacatgggga gttagggtgc cagcctccaa accccacttt ctctaaagca 4020

gggagggtttt gctcccagga gacaacggac cctgtctgga gacattcttg gttgtcaccg 4080  
ctcaggggag ggtgtcactg acatccagtg ggtagaggcc aggaatactg ctcaacatcc 4140  
tacaacacaa gagacagacc ccaacaaaga aatgcctgcc ccaaacgtcc agacggccaa 4200  
ggctgagaag ctctgggtctg agcagcctcc tgtctgacat gccgccgtca tggcccgtg 4260  
tcctgggtta agcattgctg cctcctccag gcgctcttta taaaatgtac tgccaggccg 4320  
ggcacagtgg cttacacctg taatcccaac actttgggag gccgagggtg gaggatcctt 4380  
tgagctcagg aggtcgaggc tggcctggac aacatagtga gaccccatct gaaaaaaaaa 4440  
aaaatcagct gggccagggt ggatgcctgt ggtccaggct acctgggggg ctgagggtggg 4500  
aggattgctt gagcccaaga ggtcaaggct gtagtgagct ctgatcatat cactgcactc 4560  
tagcctgggt gacagagcaa gacctttaaa aaaaaatgta ttaccggctg aggcaggagg 4620  
accacttgag ggtcaggagt tccagagcag cctgggtaac atagcaaac cctatctcta 4680  
caaaaatttt aaaaattagc tgggcatggt ggcacacgtc tatagtcgta gctacttagg 4740  
aggctgaggc aggagaatcg tttgagctca ggaggctatg aggctgcatg cagtgagtta 4800  
taatcgtgct actgcactcc atcttgggtg acagagcaag accctgtctc aaaaaaaaaa 4860  
aaaaaagaaa gaaaagaaaa aaaatgctgg gtgtgggtatc tcaccctat aatcccagaa 4920  
ctttgggagg ccagagggg aggatcactt gaggtcagga gttcgagacc aacctggcca 4980  
aagtggtgaa acccgtctc tactaaaaat acaaagaaaa ttagctagat atggtgggtg 5040  
gagcctgtaa tctcagtac tcgggaggct gaggcaggat aattgcttga atctgggaag 5100  
tggaggttgc agtgagccaa gattgcacca ctgcactcca gcatgggtga cagagtgaga 5160  
ctccatctca acatctcaa aaaaaaaaaa aaagaactta ctgcctgttg aagagttgag 5220  
caatacctaa caacctacc ctacatgtga ccaaccagcg ggtcacttcc tcctctgcag 5280  
agaggaggcg gctgccagcg agagggcact gaggtcctc ccatggccac tgcccccttg 5340  
acttctggca aagtgcccc gtccaatgag ctcatcagg gcatctcaga tcatgctttt 5400  
tctggaaata aaaagtcagt gagcagaact ccacaaatgt aaaagtgctc tcccataagt 5460  
tgttctaaat ctttggtgcc tgttgctcc tggtcagacc aacctcacc ctctgggtcat 5520  
agatgcgaaa actggtcttg ggtaatgagt tttttttttt tttttttttt agacagagtc 5580  
ttgctctgtc gcctggcaca atctcggtc actgcaacct ccacctctg ggttcaagcg 5640

attctcttgc ctcagcctcc caagtagctg ggacgacagg catgtgccac cacacccggc 5700  
taatttttgt atttttaata gagacagggt ttctccatgt tggccaggcc agtctcaaac 5760  
tcctgacctc aggtgatcca cccgactcag cctcccaaag tgctgggatt acaggcgtga 5820  
gccaccgctc ccagccctgg gtaatgagct ttgaaaaccc agcttagaaa tcttccttag 5880  
taaccatcgt gaggctagag gaggctccta ctgtacagaa attcaggtgc tgctttccta 5940  
tggaataata ggagcagatg aatcttaaca acaagtaatc aaaatgatgg tcatttgggc 6000  
agaccactgt ccagaaaaaa agaaaaaatt taaaaaagaa aattaaggct gggcttggtt 6060  
cacgcctgta atcccagcac tttggggagc tgaggtgggc agatcaattg aggccaggag 6120  
tttgagacca gccacaccaa catggtgaaa ccttgtctct actaaaaatg caaaaattag 6180  
gcatgggtgt acatgcctgt agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatcgctt 6240  
gaacctgaga ggtggagggt gcagtgagtc gagatcgcac cgttgcactc cagcctgggc 6300  
gacaaagcaa gactctgctc aaaaaaaca aaaaaaaaac aaaaaaagaa aaggaaagta 6360  
aaacaataaa tgatgggtgt cctgtgattt gctgttggtc tacgtgaggc cctgtgcatg 6420  
ggatttcaca aacatgttct tgaatcctct caaaaccagc ttgaagggtg gtggtgtctc 6480  
cctgggtgtg cagggtctgt catacagctg gcattcagca acaacaaca caaaaataga 6540  
aatgggagtc tcgctatgtt gccaggctg gtctccaact cctgggctca agtgaccctc 6600  
ctgtctcagc atcctgagta gctggaatac aggtacacac ttccacaccc aggctatcaa 6660  
ctgtttttta aatgaataaa tcaaattag caattttaca gaaggggaaa gtgaggcttg 6720  
gagagagact ttgatggaca taggacttgc ggagttttat agattcttag tttttgttcg 6780  
tttgtttgtt tttgtttttg agacagagtc ttgctctgtt gcctaggctg gagtgcagtg 6840  
gcgtgatctt gtcttactgc aacctctgcc tcccaggctt aagccgttct cctgcctcag 6900  
cctcccaagt agctgggact atagatgcgt gccaccacac ctggctaatt tttgcatttt 6960  
tagtagagac agggttaaat gttaggcaga ctggtcttaa actcctgacc tcaggtgatc 7020  
tggtgcctc ggccttcaa agtgctggga ttacagggtg gagccactgt gcccggcctt 7080  
ttttttttgt ttttctttga gatgaaaagt cactcttgct gcccaggctg gagtgcaatg 7140  
gtacgatctc agtcatggc aacctccgct tccagaattc aagcaattct cccgcctcag 7200  
cctcccaagt agctgggatt acaggcgccc gccaccatgc gcagataatt tattttattt 7260

tatttttattt attattatta ttattattat tattattatt tttgagatgg agttttcgctc 7320  
tgtcgcccag gctggagggc agtgacgcga tctcacctca ctgcaagctc cgcctcccgg 7380  
gttcacacca ttctcctgcc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc acctgccacc 7440  
acacccggct aactttttgt atttttagta gagatgggggt ttcaccatgt tagccaggat 7500  
ggctctcgatc tcttgacctc gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaaagt gttgggatta 7560  
caggtgtgag ccaccgcgtc cggccaattt ttttattttt agtagagacg aggttttcacc 7620  
atgttgccca ggctggttgc taactcctga cctcaggtga tcagcccgcc tcggcctccc 7680  
aaaatgctgg gattacaggc gtgagcccct gcacctggcc agatttagtt ttgggtgggc 7740  
caagatcttg tgcctctgat acagtcattt tccatatcat atttttgttt ctggggttct 7800  
gctgagggca gcgtgatttc atcacttgaa cactttgcgg aactgggcag gaagcactct 7860  
gcccatttca tagatgggca aactgagcct ccgtcctgtg cctcttcggg ttggggtgga 7920  
taagagcaaa acagggcagg gagtggggaa gctctgggag gccttgatca gagcgctctg 7980  
gctctgccac ttccagctt ggtggtctcc tgcgtcctca cgtgggcagg gggattgaga 8040  
cctgcagctg ggttggcatg aggtggatga agctgctggg caagtgtggg attgattttc 8100  
tgtggggact cgagtggaat gtttctctgt tggcccaggg ggaacttgag gttaagaaca 8160  
tggacatgaa gccgggggtca accctgaaga tcacaggcag catcgccgat ggcactgatg 8220  
ggtgagcaag gtttcagggt tgggggagtc tgcaggcccg gaataggcag ggcgggtggg 8280  
gcaggcaggg cagccctgtg aagtgtctag gcaagaggga cgtcaggcca atgggccctt 8340  
tttcacaccc ttctccccac accctgctg gccccactt catgtctgag gctaggtttg 8400  
gggacctgca gaatttcaga gttgatgcca tatgtcttat tcttttgccc caacagccat 8460  
tgaaggggca ggtggagaag cccctggaac tctgtctggc cccctgcggg gcaggtgcct 8520  
ctagggaacg cccaaatccc cagagacacc accctcttta cccagcagaa tggccacagg 8580  
ctggcatttc atgagcatta aaccagggca gccaccaggg gaggctgagt ggtctcgctg 8640  
gcatcctctt ggtagaacc agcggcctca ccacctccgt gagtacagt ccagcgaaag 8700  
gctctctcgc ctgcagaaca tgtcagcgca tcttggaact gtgctttatc tacttttggt 8760  
tagagagggg gcgggcagggt gcatgccata ggagctaagg gaaaagtac ttattttctc 8820  
tacttgggtc cctcaagttt gtcaaatgt gtgataccct tggcttgaga ctcccaaatg 8880

aagacacccc atgaccacaga atgccccact ttcaggaacc ctgcaggctct agcccaggct 8940  
cctgtagtga tcttgccaag aagtcataca accccggttg cacacccata gtgacaggga 9000  
gctcaccacc ttaggttggc tgctggtggc taaatttaaat aggtcttcag atatctaaga 9060  
gatagcattt ctctctccca ggagagccac cccaatttc cgaagctgtc actatcagtt 9120  
acccttctct caacagcgtg atccctgctc caaatggaat gtgctaccac agtgctaagt 9180  
ctgagcaggt tgttacctcc cttgttttaa ggcacagatc tcaactaaca caagctttga 9240  
ttcttccage ttgtggtcaa ccaaggtcct ccaacccaag ctgctttatc caggcctgag 9300  
ccctgaacct cacctgctac cccttctcct gcagctttgt aattaatctg ggccagggga 9360  
cagacaagct gaacctgcat ttcaaccctc gcttcagcga atccaccatt gtctgcaact 9420  
cattggacgg cagcaactgg gggcaagaac aacgggaaga tcacctgtgc ttcagcccag 9480  
ggtcagaggt caaggtgagg tcaaaggggg aaagggcact ggggtgatgt caaggggagg 9540  
gccagatgg aagagagcct ggcttgaca caggtgctgg ccttgtttga gccatcaggc 9600  
actgccctgg ccattttcca gggcctcctg cctccttgac accctccctc cccacagttc 9660  
acagtacct ttgagagtga caaattcaag gtgaagctgc cagatgggca cgagctgact 9720  
tttcccaaca ggctgggtca cagccacctg agctacctga gcgtaagggg.cgggttcaac 9780  
atgtcctctt tcaagttaaa agaataaaag acttcagcc g 9821

<210> 3

<211> 558

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cccccccagc tctagggacg accacacccc caccagttc tgccctgtctc tctctgcgcc 60  
tttgactctg ttgggtgggg acaaggctcc cgggcctgca ccctcccga gctctcagca 120  
tccctatttg tccaagtga cccctgaccc tggacttccg agtgcttctg ccctgcagca 180  
gccccacct ctatccttgg ggtttgagct ttgctgttctc agtcaggcag cccccaggag 240  
ctgcaagggg agtgtgggtg cttctcttag tccaggccca gctcccctat cctggcctga 300  
ctgttgcagg gctcgggggtg tgggcacagg ctgctggcag gaggcaggga gccatctcct 360



gatgcttggt gttagaygtg tgtgtgcgca gggcacacgt ctgtgagtgt ctgtgtggcg 420  
ggcacacctg tcttctgttt cttgtttgag ccccttttgg actgtcctca ctggataacc 480  
tcattctcca gagataatgg tctttgtcag tgagagactg attttttttt tttttttttt 540  
ttttttgaga cggagtct 558

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012151

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, G01N/33/15//C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, G01N/33/15, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI(DIALOG), PubMed, JSTPlus(JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RABINOVICH GA. et al., Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis., J. Exp.Med., 1999, 190(3), p.385-98	11-12
X	Rabinovich GA. et al., Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?, Trends Immunol., 2002, 23(6), p.313-20	11-12
X	WO 99/12041 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA), 11 March, 1999 (11.03.99), Particularly, Claim 10 & US 5948628 A & US 6054315 A & US 6225071 B1	11-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
24 September, 2004 (24.09.04)

Date of mailing of the international search report  
12 October, 2004 (12.10.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012151

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	OZAKI K. et al., Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro., Nature, 2004 May, 429(6987), p.72-5	5-10,13
P,X	Yozo ONISHI et al., "Genome Wide SNP Kaiseki ni yoru Shinkin Kosoku Kanren Idenshi no Tanri", The Journal of Japanese College of angiology, 2004 May, 44(5), pages 175 to 178	5-10,13
A	OZAKI K. et al., Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction., Nat.Genet., 2002, 32(4), p.650-4	5-13
A	Coville G., Human DNA sequence from clone RP5-1177I5 on chromosome 22q13. 1Contains a novel gene, the MSE55 gene for serum constituent protein MSE55, the LGALS2gene for soluble Galactose-binding Lectin 2(Galectin 2, S-Lac Lectin 2, HL14), ESTs, an STS, GSSs and two putative CpG islands, complete sequence., Database GenBank accession No.AL022315, 2003 June, particularly, complement(72609..82346)	5-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/012151

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-4  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
(See extra sheet.)
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012151

## Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Concerning "a method of judging an inflammatory disease" according to claims 1 to 4, it is stated in the description of the present case "the term "judge" as used herein means the judgment of the presence/absence of the onset of a disease, the judgment of the possibility of the onset of a disease (assumption of the onset risk), the clarification of genetic cause of a disease and so on" (p.7, lines 2-3). That is, claims 1 to 4 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

## Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claims 5 to 13 can be divided into the following invention groups.

(1) A method of detecting a gene polymorphism participating in an inflammatory disease or a method of screening a remedy for an inflammatory disease wherein galectin-2 gene or a galectin-2 gene product is employed (the inventions according to claims 5 to 10 and the parts relating to galectin-2 gene or a galectin-2 gene product in the inventions according to claims 11 to 13).

(2) A method of screening a remedy for an inflammatory disease wherein galectin-1 gene or a galectin-1 gene product is employed (the parts relating to galectin-1 gene or a galectin-1 gene product in the inventions according to claims 11 to 13).

There is no such a high homology (about 45%) between a galectin-1 gene product and a galectin-2 gene product as allowing the estimation that they belong to the same category of proteins having equivalent functions and, therefore, the above invention groups (1) and (2) have no matter in common.

That is to say, there is no matter common to the above invention groups (1) and (2) that is seemingly a special technical feature in the meaning of the second sentence of PCT Rule 13.2 and, therefore, no technical relevancy can be found between these invention groups differing from each other in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, it is obvious that claims 5 to 13 do not comply with the requirement of unity of invention.

Accordingly, the claims have the following 2 groups of inventions.

(1) The inventions according to claims 5 to 10 and the parts relating to galectin-2 gene or a galectin-2 gene product in the inventions according to claims 11 to 13.

(2) The parts relating to galectin-1 gene or a galectin-1 gene product in the inventions according to claims 11 to 13.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, G01N33/15 // C12N15/12

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, G01N33/15, C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS/WPI(DIALOG), PubMed, JSTPlus(JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	RABINOVICH GA. et al., Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. J. Exp. Med., 1999, 190(3), p. 385-98	11-12
X	Rabinovich GA. et al, Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? Trends Immunol., 2002, 23(6), p. 313-20	11-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 09. 2004

国際調査報告の発送日

12.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4 B

3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 99/12041 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA) 1999. 03. 11, 特に, 請求の範囲10 & US 5948628 A & US 6054315 A & US 6225071 B1	11-12
PX	OZAKI K. et al., Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. Nature, 2004 May, 429 (6987), p. 72-5	5-10, 13
PX	大西洋三, 他1名, ゲノムワイドSNP解析による心筋梗塞関連遺伝子の単離, 脈管学, 2004 May, 44 (5), p. 175-178	5-10, 13
A	OZAKI K. et al, Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. Nat. Genet., 2002, 32 (4), p. 650-4	5-13
A	Coville G., Human DNA sequence from clone RP5-1177I5 on chromosome 22q13.1 Contains a novel gene, the MSE55 gene for serum constituent protein MSE55, the LGALS2 gene for soluble Galactose-binding Lectin 2 (Galectin 2, S-Lac Lectin 2, HL1 4), ESTs, an STS, GSSs and two putative CpG islands, complete sequence. Database GenBank accession No. AL022315, 2003 Jun, 特に, complement (72609..82346)	5-13

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-4 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
特別ページ参照。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。  
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## &lt;第II欄1.について&gt;

請求の範囲1-4に係る「炎症性疾患の判定方法」について、本願明細書には「本明細書において、疾患の「判定」とは疾患発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断（罹患危険性の予想）、疾患の遺伝的要因の解明などをいう。」（第7頁第2-3行）旨説明されているから、請求の範囲1-4は、人体の診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

## &lt;第III欄について&gt;

請求の範囲5-13は次の発明群に分けられる。

- (1) galectin-2遺伝子またはgalectin-2遺伝子産物を用いる炎症性疾患に関与する遺伝子多型の検出方法、または炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法（請求の範囲5-10に係る発明および請求の範囲11-13に係る発明のうちgalectin-2遺伝子またはgalectin-2遺伝子産物に係る部分）
- (2) galectin-1遺伝子またはgalectin-1遺伝子産物を用いる、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法（請求の範囲11-13に係る発明のうちgalectin-1遺伝子またはgalectin-1遺伝子産物に係る部分）

galectin-1遺伝子産物とgalectin-2遺伝子産物とは、両者が同等の機能を有する一群の蛋白質であると推定するに足るほどに配列同一性を有しない（約45%）ので、上記発明群(1)-(2)に共通の事項は存在しない。

以上により、上記発明群(1)-(2)においてPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲5-13は単一性の要件を満たしていないことは明らかである。

したがって、請求の範囲には、

- (1) 請求の範囲5-10に係る発明および請求の範囲11-13に係る発明のうちgalectin-2遺伝子またはgalectin-2遺伝子産物に係る部分
- (2) 請求の範囲11-13に係る発明のうちgalectin-1遺伝子またはgalectin-1遺伝子産物に係る部分の2発明が記載されている。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**